

Finns *Clostridium difficile* i köttprodukter i Sverige?

En pilotstudie

Frida Karlsson

**Handledare: Karel Krovacek
Inst. för Biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Biträdande handledare: Gunilla Trowald-Wigh
Inst. för Kliniska vetenskaper**

TACK

Karel Krovacek, handledare, för utomordentligt stöd och hjälp med detta examensarbete och för att du tipsade mig om möjligheten att förlägga en del av det praktiska arbetet utomlands. Tack också för många roliga och givande diskussioner både gällande det aktuella ämnet, vardagsproblematik och meningen med livet.

Gunilla Trowald-Wigh, biträdande handledare, för givande återkoppling och hjälp med utformningen av det skrivna arbetet, samt engagemang och intresse beträffande resultat.

Sophie Martirani von Abercron, italiensk labkompis och sedermera väninna, för gott samarbete och många glada skratt både i och utanför labbet. Tack också för oerhörd gästfrihet under en hel månad i Neapel, för utomordentlig guidning och hjälp och för många goda middagar tillsammans.

Universitetet Parthenope, Neapel, Italien, för möjligheten att som utländsk student komma dit och praktisera, för ett väldigt trevligt bemötande av både studenter och lärare, samt för otroligt gott kaffe.

Kalle Wetterwik, medstudent och labkompis, för hjälpsamhet i labbet, utbyte av erfarenheter och i övrigt gott samarbete.

Lise-Lotte Fernström och Olov Carlsson för utmärkt teknisk assistans i labbet, för utförliga svar på många av mina frågor och för att ni alltid har funnits till hands när man behövt.

Helena Höök, för välbehövlig datasupport.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning.....	2
Litteraturbakgrund.....	3
<i>Clostridium difficile</i>	3
Historik	3
Morfologi och egenskaper	3
Förekomst.....	4
Patogenes	4
Virulensfaktorer	5
Toxiner.....	5
Adhesion	5
Kemotaxi.....	6
Kapsel	6
Hydrolytiska enzymer.....	6
Kliniska symtom och patologi	6
Behandling	7
Diagnostik	7
Antibiotika	7
Epidemiologi.....	8
<i>Clostridium difficile</i> hos djur	9
Häst.....	9
Svin.....	9
Kyckling.....	10
Nötkreatur	10
Zoonosrisk?	11
Livsmedelshygieniska aspekter.....	11
Material och metoder	13
Livsmedelsprover	13
Preparering av prover	13
Identifiering.....	13
Enzymtest.....	14
Latex-agglutinationstest	15
Alkoholchock	16
Toxin A-test	16
Toxin-B-test	18
API-test.....	19
Resultat	21
Testresultat	21
Förekomst	21
Diskussion	21
Litteraturförteckning.....	24

SAMMANFATTNING

Clostridium difficile är en grampositiv, anaerob bakterie med förmåga att bilda sporer. Bakterien finns i miljön, hos djur och är vanlig på sjukhus där den är en känd orsak till allvarlig diarré hos nedsatta patienter. På senare tid har forskare diskuterat huruvida *Cl. difficile* kan vara en ny livsmedelsburen patogen. Bakterien har isolerats från livsmedelsproducerande djur och även från köttprodukter.

I denna pilotstudie undersöktes 82 köttprodukter inköpta i svenska butiker under en period på fyra månader. Syftet var att ta reda på om *Cl. difficile* fanns i dessa livsmedel. Bakterien påträffades i två livsmedelsprover, och båda isolaten var toxinproducerande.

Eftersom detta var en mindre studie kan man ej dra några slutsatser i vilken utsträckning bakterien egentligen förekommer i livsmedel i Sverige. Mer omfattande undersökningar på området krävs.

SUMMARY

Clostridium difficile is a grampositive, anaerobe bacteria with a spore-forming ability. The bacteria is present in the environment, can be isolated from animals and is common in hospitals, where it is a known cause of severe diarrhoea in compromised patients. Lately scientists have been discussing whether *Cl. difficile* could be a new food-borne pathogen. The bacteria has been isolated from food-producing animals and from meat products.

In this pilot study 82 meat products, bought from swedish shops during a periode of four months, were investigated. The aim was to find out whether *Cl. difficile* was present in these food products. The bacteria was found in two of the food samples, and both the isolates were toxigenic.

Since this was a smaller study one cannot make any conclusions regarding the extent of presence of the bacteria in food products in Sweden. More extensive studies have to be performed.

INLEDNING

Detta är en pilotstudie med syfte att ta reda på om en viss bakterie, *Cl. difficile*, förekommer i köttprodukter i svenska matbutiker. Studien är gjord inom ramen för ett examensarbete på veterinärprogrammet, SLU, Uppsala.

Clostridium difficile är en anaerob, grampositiv stav med sporbildande förmåga. Den är vanligt förekommande i jord, sediment och vattendrag (Al Saif & Brazier, 1996) och hittas dessutom ofta i olika sjukhusmiljöer (Barbut & Petit, 2001). Bakterien är en känd orsak till sjukhusdiarré hos människor (Bartlett *et al*, 1978, George & Symonds, 1978, George *et al*, 1978, Larsson *et al*, 1978). Detta är ett allvarligt tillstånd som kan drabba allmänt nedsatta patienter som vistas en längre tid på sjukhus, och ofta står under antibiotikabehandling (Elliot *et al*, 2007).

Bakterien har även isolerats från många olika djurslag, exempel är häst, hund och katt (Båverud *et al*, 1997, Arroyo *et al*, 2005, Simango, 2006, Lefebvre *et al*, 2006), men även hos livsmedelsproducerande djur som nötkreatur, svin och kyckling (Songer *et al*, 2000, Rodriguez-Palacios *et al*, 2006, Simango & Mwakurudza, 2008). Den kan påträffas hos sjuka djur, men förekommer även hos symptomlösa bärare.

Upptäckten att *Cl. difficile* finns hos djur är inte ny, men på senare år har man funnit att bakteriestammar som påträffats hos djur även kan isoleras från människa (Arroyo *et al*, 2005). Detta har skapat diskussion om eventuella zoonosrisker med bakterien (Arroyo *et al*, 2005, Lefebvre *et al*, 2006, Rodriguez-Palacios *et al*, 2006, Rupnik, 2007, Simango & Mwakurudza, 2008). Ingen vet ännu hur bakterien överförs mellan djur och människa. När en kanadensisk forskargrupp nyligen isolerade *Cl. difficile* från köttprodukter ämnade för humankonsumtion väcktes därför ytterligare en fråga (Rodriguez-Palacios *et al*, 2006). Är *Cl. difficile* en ny livsmedelsburen patogen?

Bakterien har hittills påvisats i kött i Nordamerika och Sydeuropa (Rodriguez-Palacios *et al*, 2007, McClain, 2006, Bouttier *et al*, 2008). Hur ser det då ut i de nordligare delarna av Europa? Kan det finnas *Cl. difficile* i köttprodukter i Sverige? Denna fråga ska jag med detta examensarbete försöka besvara.

LITTERATURBAKGRUND

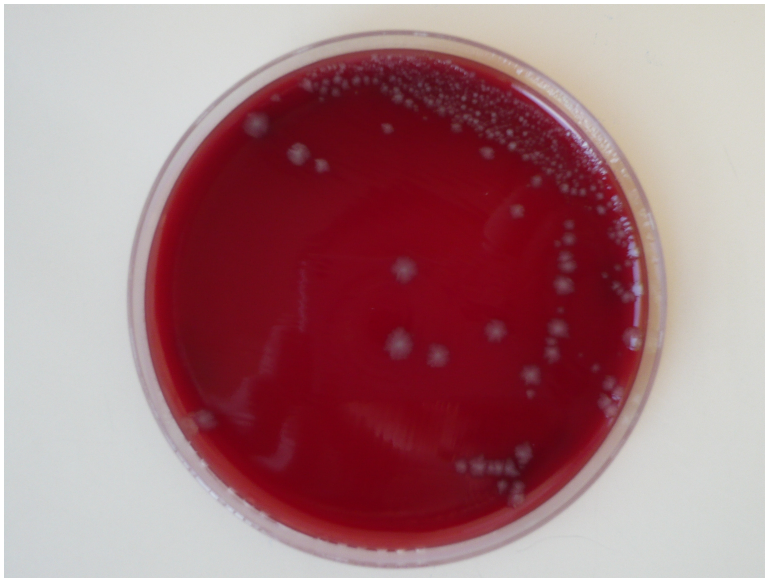
Clostridium difficile

Historik

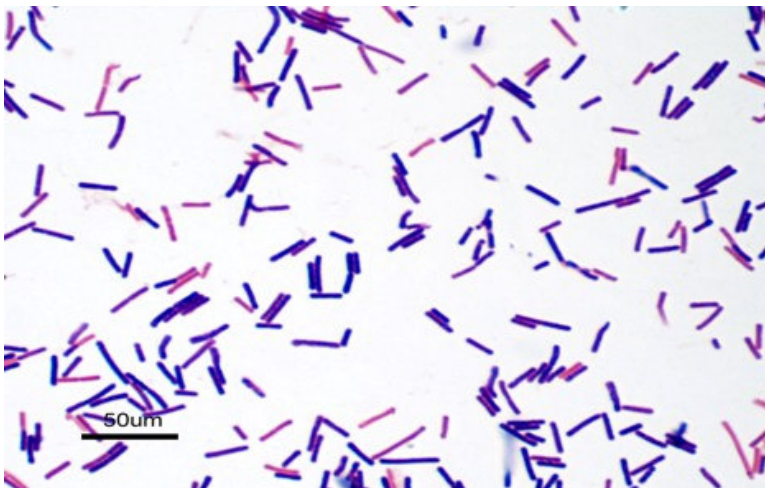
Clostridium difficile har varit känd sedan 1935, då den isolerades av några forskare från avföringsprov från friska spädbarn (Hall & O'Toole, 1935). På grund av svårigheter att odla och studera bakterien kallades den först för *Bacillus difficile*. Senare klassificerades den till släktet *Clostridium* inom familjen Clostridiaceae.

Morfologi och egenskaper

Clostridium difficile är en stor, grampositiv stav som är obligat anaerob och sporbildande. Efter inkubering på blodagar i 48 timmar vid 37°C framträder bakterien med stora, grå, oregelbundna, icke hemolyserande kolonier. (Figur 1, figur 2). Kolonierna fluorescerar under UV-ljus, och är dessutom kända för sin karaktäristiska, stickande lukt av hästgödsel.



Figur 1: *Cl. difficile* på FAA (Foto: Martirani & Karlsson).



Figur 2: Gramfärgning (Foto: Krovacek et al).

Förekomst

Clostridium difficile är en vanlig omgivningsbakterie, och har isolerats från t.ex. jord, sand, och vattendrag (Al Saif & Brazier, 1996). Den har också hittats i sjukhusmiljöer (Barbut & Petit, 2001), samt isolerats från många olika djurslag (Båverud *et al*, 1997, Songer *et al*, 2000, Arroyo *et al*, 2005, Simango, 2006, Lefebvre *et al*, 2006, Rodriguez-Palacios *et al*, 2006, Simango & Mwakurudza, 2008). Bakterien ingår vanligen inte i en frisk människas tarmflora, även om det finns symtomlösa bärare (Elliot *et al*, 2007). Den är däremot vanligare förekommande hos neonatala individer, som ännu inte har hunnit utveckla en normal bakterieflora i tarmen.

Patogenes

Även om bakterien upptäcktes så tidigt som på trettioalet var det inte förrän fyra decennier senare, på 70-talet, som *Cl. difficile* sattes i samband med så kallad sjukhusdiarré hos människor (Bartlett *et al*, 1978, George & Symonds, 1978, George *et al*, 1978, Larsson *et al*, 1978).

Begreppet sjukhusdiarré innefattar ett tillstånd med diarré som framför allt drabbar äldre och/eller allmänt nedsatta personer som vistas en tid på sjukhus, och ofta står under antibiotikabehandling. Andra namn på tillståndet är antibiotikaassocierad diarré (AAD), *Clostridium difficile*-associerad diarré (CDAD) eller, vid gravare, längre gångna fall, pseudomembranös colit (PMC).

Antibiotikaterapi är den mest signifikanta riskfaktorn för infektion med *Cl. difficile*. (Elliot *et al*, 2007). Andra kända riskfaktorer för patienter är hög ålder, annan allvarlig underliggande sjukdom, långvarig sjukhusvistelse, nässvalgssond samt behandling med protonpumpshämmare eller immunosuppressiva medel (Bignardi, 1998, Mylonakis *et al*, 2001).

Den normala bakteriefloran i tarmen utgör ett naturligt skydd mot tillväxten av patogena bakterier. Denna skyddsbarriär brukar kallas för kolonisationsmotstånd (Borriello, 1998). För att infektion med *Cl. difficile* ska kunna uppträda krävs att denna barriär manövreras ut så att bakterien kan växa till, och att patienten därigenom utsätts för dess sjukdomsframkallande förmåga.

Patienten får i sig sporer via munnen (Borriello, 1998, Elliot *et al*, 2007). Troligen är det sporer det rör sig om, eftersom de anaeroba bakterierna har svårt att klara sig särskilt länge i en aerob omgivning. Sporererna tar sig förbi den sura magsaften, och kan gro i terminala ileum. Därefter förökar sig bakterierna i colon och börjar producera toxiner, framför allt toxin A och toxin B. Toxinerna verkar synergiskt. Båda toxinerna påverkar tarmcellernas cytoskelett, och det får effekten att tight-junctions mellan celler löses upp och att epitelets permeabilitet ökar (Voth & Ballard, 2005). Även den vaskulära permeabiliteten samt blödningstendensen ökar. När kärlens genomsläpplighet blir större kommer det att ske ett ökat utträde av albuminrik vätska till tarmen (Borriello, 1998). Patientens proteaser (proteinnedbrytande enzymer) kommer då ha fullt upp med att bryta ned denna proteinrika vätska istället för toxinerna, och på så sätt undgår toxinerna att degraderas.

Bakterierna kan också adherera till epitelet och frisläppa toxiner lokalt, samt frisätta olika vävnadsnedbrytande enzymer. Neutrofiler rekryteras till området, och deras aktivitet kommer orsaka ytterligare skada på tarmen. Slutresultatet blir lokal nekros och att ett pseudomembran utvecklas. Den pseudomembranösa coliten är ett faktum.

Virulensfaktorer

Toxiner

Clostridium difficile är sjukdomsframkallande framför allt genom produktion av toxiner (Elliot *et al*, 2007). De två viktigaste toxinerna som bakterien producerar är toxin A och toxin B. Båda dessa är exotoxiner. Toxin A definieras som ett enterotoxin och toxin B som ett cytotoxin. Den största skillnaden mellan toxinerna är att toxin A kan orsaka ansamling av vätska i tarmen, till skillnad från toxin B (Borriello, 1998). Båda har dock förmågan att verka cytotoxiskt, d.v.s. orsaka irreversibel skada på celler. Denna effekt är mer uttalad hos toxin B än toxin A (Riegler *et al*, 1995). Båda toxinerna med molekylmassor på 308 respektive 270 kDa tillhör bland de största toxinerna som man idag känner till (Voth & Ballard, 2005).

Olika stammar av bakterien producerar olika mycket av toxin A och toxin B. De flesta högvirulenta stammar tillverkar båda toxinerna (Kuijper *et al*, 2006). Tidigare trodde man att det framför allt var toxin A som var den viktigaste virulensfaktorn hos bakterien, men sedan kom rapporter som beskrev toxin A-negativa men toxin B-positiva stammar som var ändå sjukdomsframkallande (Alfa *et al*, 2000, Kuijper *et al*, 2001, Pituch *et al*, 2006, Lysterly *et al*, 1992).

Man har också upptäckt stammar som producerar ytterligare ett toxin, ett så kallat binärt toxin (Perelle *et al*, 1997). Än så länge vet man inte tillräckligt om toxinet för att avgöra dess kliniska betydelse (Geric *et al*, 2006).

Adhesion

Adhesion eller vidhäftning är viktig för att bakterierna ska kunna fästa vid värdens celler och utöva sin verkan. Det är sedan länge klarlagt att *Cl. difficile* har denna förmåga, då adhesion till humana epitelceller beskrevs så tidigt som 1979 för första gången (Borriello, 1979). I efterföljande försök kunde man i hamstermodeller visa att högvirulenta stammar har bättre adhesionsförmåga än lågvirulenta sådana, samt att virulenta stammar fäster bättre än avirulenta stammar (Borriello *et al*, 1988). Adherensen är mest uttalad i slutet på ileum, samt i caecum. År 2006 visades för första gången att bakterien hade förmåga att adherera till equina tarmceller (Taha *et al*, 2007). I samma studie kom man också fram till att en viss artspecifik adhesionsförmåga förelåg. Equina isolat tycktes fästa lättare till equina celler än till humana celler, och tvärtom.

Olika tänkbara adhesiner hos bakterien har föreslagits, men vilka som har den största betydelsen vet man ej. I slutet av åttiotalet kunde man visa att bakterien kan uttrycka fimbrier (Borriello *et al*, 1988). Något samband mellan närvaron av

fimbrier och förmåga att fästa till tarmmucosa kunde dock ej visas. Senare har upptäckts att *Cl. difficile* är rörlig och har flageller (Borriello, 1998). Det spekuleras i om dessa flageller kan fungera som adhesiner. Man har också hittat värmestimulerade proteiner, och dessa verkar enligt försök ha betydelse för bakteriens adhesionsförmåga (Eveillard *et al*, 1993), (Karjalainen *et al*, 1994).

En bakteries ytladdning kan också påverka dess förmåga att adherera till celler. *Clostridium difficile* har en positiv laddning på sin yta, och detta gör att den eventuellt kan adherera till celler med negativ laddning (Krishna *et al*, 1996).

Kemotaxi

Kemotaxi innebär en dragning till, eller bortstötning från, vissa kemiska ämnen. För att detta ska kunna ske krävs att en bakterie är rörlig. Vanligen blir bakterier rörliga om de kan uttrycka flageller, och detta kan *Cl. difficile* (Borriello, 1998). I försök 1990 visades dessutom att tarmslem kan fungera kemoattraherande på *Cl. difficile* (Seddon *et al*, 1990). I teorin kan alltså bakterien förflytta sig från tarmlumen mot tarmepitelet, och har då större chans att adherera till detta (Borriello, 1998).

Kapsel

Om en bakterie kan skydda sig från att bli uppäten av fagocyterande celler kan den på så sätt förlänga sin överlevnad och därmed öka sin virulens. *Clostridium difficile* har en polysackaridkapsel som ger den ett skydd mot fagocytos (Davies & Borriello, 1990).

Hydrolytiska enzymer

Bakteriens förmåga att producera hydrolytiska enzymer har studerats av vissa forskare. Den mest omfattande studien gjordes av Seddon *et al*, 1990. De fann att hos *Cl. difficile* var produktion av enzymerna hyaluronidas, chondroitin-4-sulfatas och heparinas vanligast. Man tror att dessa enzymer genom att bryta ned vävnad bidrar till skadorna som uppkommer i tarmen, ökar vätskeansamlingen samt hjälper till med bakteriens försörjning av näring (Borriello, 1998).

Kliniska symtom och patologi

Symtomen vid sjukhusdiarré hos människa varierar mycket mellan individer. Det kan röra sig om lindrig, övergående diarré eller kraftig diarré med magsmärtor, kramper och nedsatt allmäntillstånd. Ibland övergår diarrén till pseudomembranös colit, ett allvarligare tillstånd med risk för patientens liv (Elliott *et al*, 2007, Borriello, 1998).

Vid endoskopering kan man ibland se pseudomembran som vita eller gula plaque i colon. Plaquen är mellan ett par mm till två cm stora, och mellan dessa kan slemhinnan se normal ut (Borriello, 1998). Pseudomembranet består av en blandning av mucus, debris och immunförsvarsceller som sitter på

tarmslemhinnan (Mylonakis *et al*, 2001). Frånvaron av ett pseudomembran utesluter dock inte diagnosen, som är svår att ställa enbart på kliniska symtom.

Behandling

Vid behandling av CDAD sätts den antibiotika som misstänks vara orsaken till sjukdomen ut och patienten behandlas understödjande (Mylonakis *et al*, 2001). I lindriga fall tillfrisknar då patienten av sig själv. Vid allvarigare fall behandlas de diarrédrabbade patienterna med Vancomycin eller Metronidazol. Dessa läkemedel brukar vara effektiva, men det finns enstaka rapporter om att behandlingssvikt kan föreligga (Pepin, 2005, Pelaez, 2002, Bishara, 2006).

Diagnostik

För att kunna ställa diagnosen CDAD måste man påvisa toxiner i faeces från en sjuk patient, eller odla fram själva bakterien och sedan visa att denna är toxinproducerande (Kuijper *et al*, 2006). Framodling av bakterien är en bra metod men det tar lång tid att få resultat. När man har fått fram isolaten måste man sedan bestämma om de är toxinproducerande eller ej.

Många olika kommersiella kit för toxinbestämning av framför allt toxin A finns idag tillgängliga (Elliott *et al*, 2007). Dessa tester har fördelen att de är snabba att utföra, men nackdelen är att många laboratorier enbart testar för toxin A. Stammar som är toxin A-negativa men toxin B-positiva upptäcks då ej. Eftersom fler och fler kommersiella kit som kan detektera både toxin A och B kommer ut på marknaden blir detta problem allt mindre.

Standardproceduren vid detektion av toxin B är dock fortfarande att påvisa cytotoxicitet på olika cellkulturer, så kallad "tissue culture cytotoxicity assay". Metoden är känslig och mycket specifik. För att kunna utföra testet krävs det dock att laboratoriet har tillgång till odling av vissa cellinjer. Det tar också minst 24 timmar innan testresultaten är tillgängliga.

Vid epidemiologiska studier vill man ofta typa isolat för att kunna placera enskilda fall i ett större sammanhang. *Clostridium difficile* kan delas in i mer än 150 ribotyper och 24 toxinotyper (Kuijper *et al*, 2006). Ett exempel på detta är den hypervirulenta varianten ribotyp 027, toxinotyp III. Vid toxinotypning undersöker man en speciell del av bakteriens genom som kallas patogenicitetsloкус. Beroende på utseendet hos detta segment kan man se vilka toxiner just denna bakterie producerar. Vid ribotypning använder man sig av PCR, där man amplifierar och jämför vissa regioner i bakteriens ribosomala RNA.

För mer ingående beskrivningar av diagnostik som använts i detta examensarbete hänvisas till avsnittet material och metoder.

Antibiotika

CDAD kan som tidigare nämnts framkallas av antibiotikaanvändning. Antibiotikan påverkar mikrofloran i tarmen så att *Cl. difficile* får en chans att

växa till (Kuijper *et al*, 2006). Om *Cl. difficile* är resistent mot den aktuella antibiotikan är risken högre att drabbas av CDAD (Gerding, 2004). Många olika typer av antibiotika har under årens lopp visat sig kunna orsaka AAD. Exempel är betalaktamer, cephalosporiner, linkosamider och fluorokinoloner (Bignardi, 1998). Statistiskt signifikanta samband mellan långvarig antibiotikabehandling och CDAD, liksom multipel antibiotikabehandling och CDAD har konstaterats.

Under sjuttioalet hade klindamycin (linkosamid) rollen som största boven avseende utveckling av CDAD hos behandlade patienter (Gerding, 2004). När användningen av detta läkemedel minskade gick den relativa risken ned och på åttiotalet tog istället olika typer av cephalosporiner över denna roll. På senare tid har fluorokinolonerna seglat upp som ett orosmoln på horisonten. En ny, högvirulent variant av *Cl. difficile*, ribotyp 027, har visat sig resistent mot fluorokinoloner och har orsakat flera sjukdomsutbrott både i Nordamerika och Europa (Elliott *et al*, 2007). I Sverige pågår sedan 2007 ett projekt i Smittskyddsinstitutets regi där man undersöker moxifloxacinresistens hos funna *Cl. difficile* isolat. (Smittskyddsinstitutet, 2007). Moxifloxacin är en typ av fluorokinolon. I Sverige har man ännu inte hittat något moxifloxacinresistent isolat av varianten 027.

Epidemiologi

CDAD anses idag vara den vanligaste nosokomiala (sjukhusspridda) tarmsmittan i världen. År 2007 insjuknade 8276 personer i Sverige p.g.a. en infektion med *Cl. difficile* (Smittskyddsinstitutet, 2008a). I England är smittan ett mycket stort problem, och 2003 dog dubbelt så många människor till följd av CDAD som MRSA (Kuijper *et al*, 2006).

Clostridium difficile förekommer som tidigare nämnts ofta i sjukhusmiljöer. Sporerne kan överleva i månader i miljön på ett sjukhus, och är dessutom motståndskraftiga mot många vanliga rengöringsmedel (Kim *et al*, 1981). Man tror att patienten smittas via kontaminerade ytor, andra sjuka patienter och sjukhuspersonal som överför smittan på sina händer. Denna smittöverföring är dock inte helt klarlagd. Man vet helt enkelt inte om en kontaminerad miljö är en orsak till, eller en konsekvens av, sjukhusdiarré (Kuijper *et al*, 2006). Klart är dock att god handhygien och flitigt användande av tvål och vatten minskar bakteriens förekomst på personalens händer.

Angående rengöringsmedel så är det svårt att hitta effektiva sådana som dessutom är någorlunda miljövänliga (Kuijper *et al*, 2006). Desinfektionsmedel innehållande alkohol är direkt olämpliga, då de stimulerar till sporbildning hos bakterien. Medel innehållande klorin är bättre, men det finns olika rapporter angående deras effektivitet. Fosfatbuffrad hypoklorit tycks vara bättre än obuffrad sådan. Desinfektering med ånga innehållande väteperoxid kan också fungera.

Som tidigare beskrevs drabbas framför allt nedsatta, hospitaliserade individer av sjukdom till följd av *Cl. difficile*. Det har ansetts ovanligt med fall som ej föregåtts av antibiotikabehandling (Kuijper *et al*, 2006). De senaste åren har det dock kommit rapporter som talar för att en förändring i bakteriens virulens håller på att ske. Folk som drabbas blir sjukare än tidigare, det är högre risk för återfall och

komplikationer, och mortaliteten har också stigit. Sjukdom har även observerats hos unga, i övrigt friska individer som tidigare ansetts vara en lågriskpopulation (Chernak *et al*, 2005). En del av dessa hade överhuvudtaget inte blivit behandlade med antibiotika innan sjukdomen utbröt. Det kan också finnas indikationer på att individer blivit smittade ute i samhället och inte på sjukhus. Denna utveckling är oroande, men ännu vet man inte tillräckligt om detta för att dra några långtgående slutsatser.

En särskilt högvirulent variant av *Cl. difficile*, ribotyp 027, toxinotyp III har beskrivits i dessa sammanhang både i Nordamerika och Europa (Kuijper *et al*, 2006). Denna ribotyp orsakade först flera sjukdomsutbrott i Kanada och Nordamerika, och har sedan upptäckts vid liknande utbrott i Europa. På förekommen anledning har därför ett antal europeiska arbetsgrupper tagit initiativ till ett gemensamt övervakningsprogram som skall hålla koll på spridningen av denna variant (Kuijper *et al*, 2008).

Sverige har ännu inte haft något utbrott orsakat av den hypervirulenta typen av *Cl. difficile*. I så kallade historiska isolat, insamlade mellan 1997 och 2001 har man dock hittat den (Kuijper, *et al*, 2007), och det första fallet av sjukhusdiarré orsakad av denna stam har redan inträffat. Detta fall upptäcktes i februari 2007 på Akademiska sjukhuset i Uppsala (Smittskyddsinstitutet, 2008b), och föranledde smittskyddsläkaren att utfärda lokal anmälningsplikt och smittspårningsplikt i länet angående den aktuella stammen.

***Clostridium difficile* hos djur**

Häst

Problemet med *Cl. difficile*-associerad diarré finns dock inte bara på humansidan. Inom veterinärmedicinen är överväxt av *Cl. difficile* vid antibiotikabehandling hos vuxna hästar sedan länge ett känt problem (Båverud *et al*, 1997). Detta gäller inte bara hästar som själva antibiotikabehandlas. Även ston vars föl behandlas med erytromycin eller rifampicin löper risk att bli sjuka (Båverud *et al*, 1998). Symtomen vid CDAD på häst är plötsligt insättande, vattnig diarré, nedsatt allmäntillstånd, missfärgade slemhinnor, feber, kraftig dehydrering, metabolisk acidosis, hypovolemi och toxinemi. Mortaliteten är hög på hästar som drabbas.

Bakterien har förutom hos häst dessutom isolerats från många andra djurslag. Exempel är get (Simango, 2005), hund och katt (Arroyo *et al*, 2005, Lefebvre *et al*, 2006). Olika forskare runt om i världen har också börjat titta närmare på bakteriens förekomst hos de livsmedelsproducerande djurslagen. Observera att även hästar och getter räknas som livsmedelsproducerande djur i vissa delar av världen. Denna text är dock skriven ur ett svenskt perspektiv.

Svin

Studier på gris har intensifierats de senaste åren, och vissa forskare hävdar att CDAD är den vanligaste diagnosticerade orsaken till neonatal enterit hos svin i USA (Songer & Anderson, 2006). Det typiska fallet av en sjuk gris är en kuling, en till sju dagar gammal, som drabbas av diarré strax efter födseln (Songer *et al*,

2000). Grisarna kan också ofta uppvisa respiratoriska symtom. Plötsliga dödsfall förekommer (Songer, 2004). Obduktionsfynd omfattar ödem i mesocolon, ascites och eller hydrothorax (Songer *et al*, 2000). Grovtarmarna brukar vara fyllda av vattnig eller krämig, gul avföring. De gula plaque i colon som kan observeras vid endoskopi av sjuka människor kan dock ej hittas vid obduktion av svin som dött till följd av *Cl. difficile*-orsakad sjukdom (Songer & Anderson, 2006).

Mikroskopiskt kan man se purulenta foci i colons lamina propria, neutrofila ansamlingar i mesocolon, erosioner på slemhinnan i colon och kraterliknande lesioner som utgörs av neutrofiler och fibrin i tarmlumen (Songer *et al*, 2000). Tunntarmarna brukar vara opåverkade hos grisar som enbart är infekterade med *C. difficile*.

Diagnosen porcin CDAD ställs genom att man påvisar toxin A eller toxin B i faeces eller tarminnehåll från sjuka eller döda grisar (Songer, 2004). Observera att det även förekommer att grisar utan tecken på diarré testas positivt på toxintester, och alltså fungerar som symptomlösa bärare av bakterien.

I sin artikel från 2000 nämner Songer att en tänkbar orsak till att de unga grisarna drabbas av CDAD skulle kunna vara användningen av profylaktisk antibiotika inom grisproduktionen. Han tillägger dock att det inte finns tillräckliga data för att dra några slutsatser angående detta.

Kyckling

I Zimbabwe undersökte ett forskarteam nyligen förekomsten av *Cl. difficile* i faeces från kycklingar (Simango & Mwakurudza, 2008). Kycklingarna befann sig på en marknadsplats i Harare, och faecesprover samlades upp från de burar där kycklingarna hölls. Även jordprover från marknadsplatsen samlades in. *Cl. difficile* kunde isoleras från 29% av träckproverna, respektive 22% av jordproverna. 89,7% av isolaten från kycklingarna var toxinproducerande. Motsvarande siffra för jordproverna var 95,5%.

Forskarna föreslog i artikeln att kycklingar kan tänkas vara en reservoar för bakterien, och diskuterade eventuella risker för smittöverföring till människa. Eftersom kycklingarna såldes på en marknad där även andra livsmedel som t.ex. frukt och grönsaker förvarades, såg artikelförfattarna en uppenbar kontaminationsrisk.

Nötkreatur

Även från nötkreatur har man kunnat isolera bakterien. I en undersökning på kalvar i Ontario i Kanada ville man bland annat utvärdera vilken roll *Cl. difficile* kunde tänkas ha vid kalvdiarré (Rodriguez-Palacios *et al*, 2006). Av 278 träckprovtagna kalvar hade 144 diarré, medan 134 friska kalvar fungerade som kontroll. Bakterien kunde isoleras från 7,6% av diarrékalvarna, medan motsvarande siffra för kontrollgruppen var 14,9%. Toxiner kunde påvisas hos 39,6% av kalvarna med diarré, jämfört med 20,9% av kalvarna i kontrollen.

Av undersökningen kunde man dra slutsatsen att *Cl. difficile* var vanligt förekommande hos kalvar i Ontario, oavsett om de hade diarré eller ej. Att kontrollgruppen visade på en högre förekomst var förvånande, men man ville ej dra några konklusioner av detta. Studien visade också att bakterien var vanligare förekommande hos yngre kalvar än hos äldre. Kring detta resonerade man att yngre djur har en sämre utvecklad egen mikroflora i tarmen, och därför är mer mottagliga för kolonisation med *Cl. difficile*.

Zoonosrisk?

Länge har man ansett att de stammar av *Cl. difficile* som kan påvisas hos våra husdjur skiljer sig från dem man kan isolera från människa. I en studie från 1993 jämförde några australiensiska forskare isolat från människor och husdjur (O'Neill *et al*, 1993). Syftet var att titta närmare på eventuell risk för transmission mellan djur och människa. Ingen överlappning av isolaten kunde ses i studien, men forskarna ville ändå inte förkasta tanken på smittöverföring mellan arter.

Åtskilliga år senare gjordes en ny jämförande studie i Ontario, Kanada (Arroyo *et al*, 2005). Den här gången undersöktes 133 isolat. Nittiotvå av dessa var från hundar, 21 från hästar, 20 från människa, och så ytterligare ett vardera från en kalv och en katt. Studien visade att även om man kunde hitta ett antal olika PCR ribotyper hos varje djurslag, så var det ofta en eller ett par som dominerade. Den vanligaste ribotypen hos människa i den här undersökningen kunde inte hittas hos något av de andra djurslagen. Dock visade det sig ändå att 25% av isolaten från människa var identiska med isolat från ett eller flera djurslag. Ett så tydligt samband hade tidigare aldrig visats.

Man jämförde i en tidigare nämnd studie isolat från kalvar med isolat från humana patienter (Rodriguez-Palacios *et al*, 2006). Intressant nog hittades flera stammar hos kalvarna som kunde fastslås vara identiska med isolat från människor. Forskarna kunde inte hitta någon epidemiologisk förklaring till detta, men diskuterade den möjliga risken att nötkreatur kan fungera som smittreservoar för människa. Man kunde med studien dock inte fastslå denna smittöverföring.

Att flera stammar av *Cl. difficile* inte tycks vara djurslagsspecifika gör att forskare över hela världen nu diskuterar eventuella zoonosrisker (Arroyo *et al*, 2005, Lefebvre *et al*, 2006, Rodriguez-Palacios *et al*, 2006, Rupnik, 2007, Simango & Mwakurudza, 2008). Ingen har dock ännu visat att transmission mellan djurslag sker, eller i så fall hur denna går till.

Livsmedelshygieniska aspekter

Om *Cl. difficile* kan isoleras från livsmedelsproducerande djur kan man inte utesluta att den också kan förekomma i livsmedel av animaliskt ursprung. Detta resonemang förde några kanadensiska forskare när de bestämde sig för att undersöka huruvida olika köttprodukter i Kanada och Nordamerika innehöll *Cl. difficile* (Alexander-Rodriguez-Palacios *et al*, 2007). Intresset hade delvis väckts genom deras studier av bakteriens förekomst hos kalvar i Kanada (Alexander-Rodriguez-Palacios *et al*, 2006).

Studien på köttprodukter var den första i sitt slag i världen. Tidigare hade ingen letat efter *Cl. difficile* i kött ämnat för humankonsumtion. Två studier av intresse hade dock föregått denna, och de nämns också i den kanadensiska artikeln. Den ena var en undersökning på vacuumförpackat kött från 1996, där man hittade *Cl. difficile* (Broda *et al*, 1996). Den andra var en studie på rått kalkonkött ämnat för råfoderdiet till hund, där man också upptäckte *Cl. difficile* (Weese *et al*, 2005).

Den kanadensiska studien omfattade nöt- och kalvfärs. Resultaten visade att 20% av de undersökta 60 livsmedelsproverna innehöll *Cl. difficile*, och att ett flertal av stammarna dessutom var toxinproducerande. Siffran var högre än man väntat sig, och studien har därmed väckt stort intresse runt om i världen.

I en efterföljande fransk studie testades 65 prover av nötfärs och 50 prover av fläskkorv (Bouttier *et al*, 2008). Här hittades *Cl. difficile* i 4,6% av nötköttet. Inga fynd gjordes i fläskköttet. De franska forskarna pekar på att resultaten än så länge är preliminära, och att ytterligare undersökningar är på gång.

Ytterligare en studie har gjorts, denna gång i USA (McClain, 2006). Studien omfattade 81 prover av bl.a. nötfärs, fläskfärs, kalkonfärs och chorizo. *Cl. difficile* hittades i 30% av dessa prover. Det framgår dock ej vilket typ av kött som testades positivt.

Frågan huruvida *Cl. difficile* kan anses vara en ny livsmedelsburen patogen diskuteras nu på olika håll i världen. Klart är att sjukdom orsakad av *Cl. difficile* är på frammarsch i Nordamerika och i Europa. Bevisat är också att bakterien kan finnas i livsmedel, både i Kanada och i Mellaneuropa. Ännu har inga undersökningar på kött i norra Europa redovisats. Detta blir den första.

MATERIAL OCH METODER

Livsmedelsprover

Under perioden 2008-04-04 till 2008-09-04 gjordes inköp av olika köttprodukter i ett område omkring Uppsala. Totalt undersöktes 82 prover. (Tabell 1). Vissa av proverna var butikspackade, andra centralt packade. Antal prover inköpta per månad var: april: 32, maj: 20, juni: 10, september: 20. Köttprodukterna transporterades i kylväskor till laboratoriet, förvarades sedan i kylrum innan undersökningen. Proven numrerades 1-82.

Tabell 1. Fördelning av livsmedelsprover

Typ av köttprodukt	Antal
Nötfärs	32
Fläskfärs	11
Blandfärs	12
Lammfärs	7
Viltfärs	2
Kalvfärs	1
Fågelfärs	2
Hamburgare/kebabspett av nötfärs	5
Biff av blandfärs	1
Tillagad biff av nötfärs	1
Charkuterier av fågelkött	2
Charkuterier av nöt- och fläskkött	6
Totalt	82

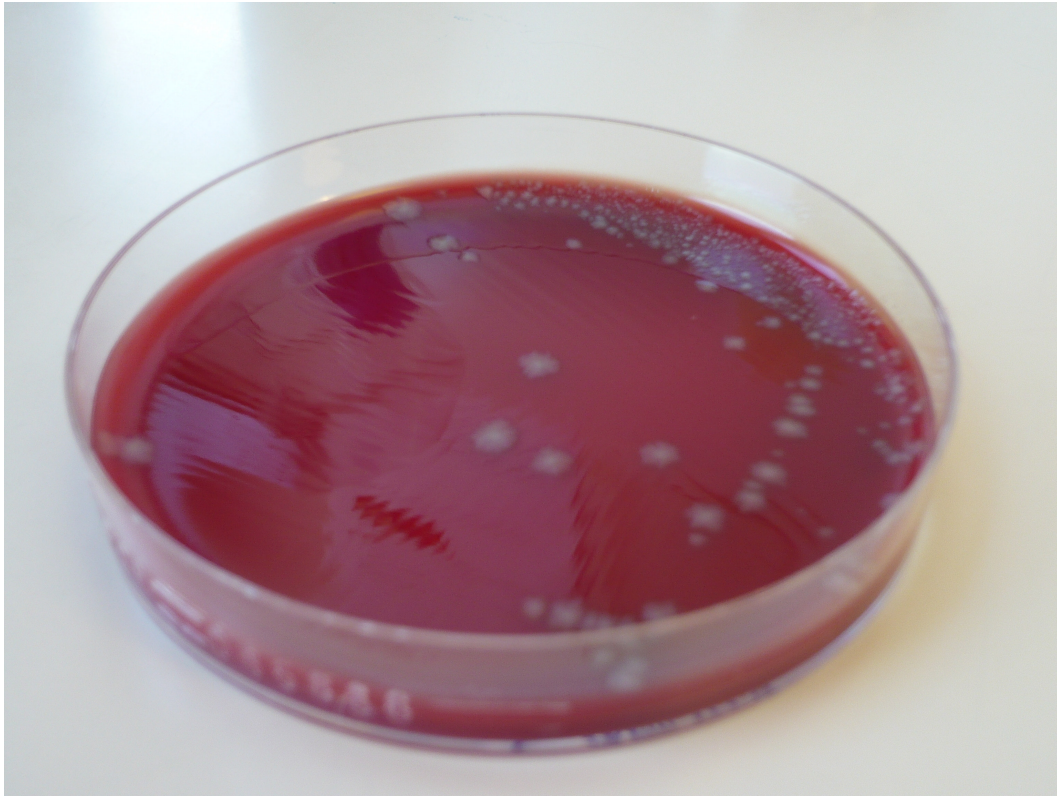
Preparering av prover

I laboratoriet vägdes 25 g av varje livsmedelsprov upp och placerades i en steril stomacherpåse med hjälp av sterila instrument. I de fall där provmaterialet behövde finfördelas ytterligare gjordes detta med steril sax. Till påsen tillsattes ca 50 ml *Cl. difficile* anrikningbuljong (CM0601, Oxoid, Basingstoke, England). Blandningen av köttet och buljongen mixades för hand. Utstryk med steril plastögla gjordes sedan direkt från buljongblandningen på Fastidious Anaerob Agar (FAA, Lab 90, Lab M, England) med tillsatt 5% hästblod, respektive *Cl. difficile* selektivagar (CM0601, Oxoid, Basingstoke, England) med tillsatt moxalactam, norfloxacin och cysteinhydroklorid (CDMN, SR0173E) och 5% hästblod. Agarplattorna inkuberades i 48 timmar vid 37°C, i anaerob miljö. Stomacherpåsarorna inkuberades anaerobt under 10-12 dagar. Agarn och buljongen hade tillverkats enligt godkända metoder på ackrediterat laboratorium, SVA, Uppsala.

Identifiering

Vid avläsning efter 48 timmars inkubering ströks misstänkta kolonier på nytt på FAA och inkuberades i 48 timmar, 37°C, anaerob miljö. För att underlätta

identifiering av misstänkta kolonier jämfördes dessa med referensstammen CCUG 19126 som också den strukits på FAA och selektivagar. Kriterier för att misstänka *Cl. difficile* var att kolonin skulle vara grå, skrovlig, lätt upphöjd, icke hemolytisk och stall-/hästluktande. (Figur 3). För att anses vara en presumtiv *Cl. difficile* krävdes också att gramfärgningen visade grampositiva eller gramvariabla, stora stavar.



Figur 3: *Cl.difficile* på FAA (Foto: Martirani & Karlsson).

Enzymtest

Nästa steg var att hos misstänkta kolonier undersöka närvaro av enzymet L-prolin aminopeptidas. Detta enzym produceras av *Cl. difficile*. Testet inkluderar testkort indränkta med L-prolinyl 7 amido-4-methylcoumarin (PRO-AMC) (Oxoid Limited, Basingstoke, England). Vid tillsats av O.B.I.S. DMAC Developer bildas en cerise färg vid närvaro av enzymet L-proline aminopeptidas. (Figur 4).

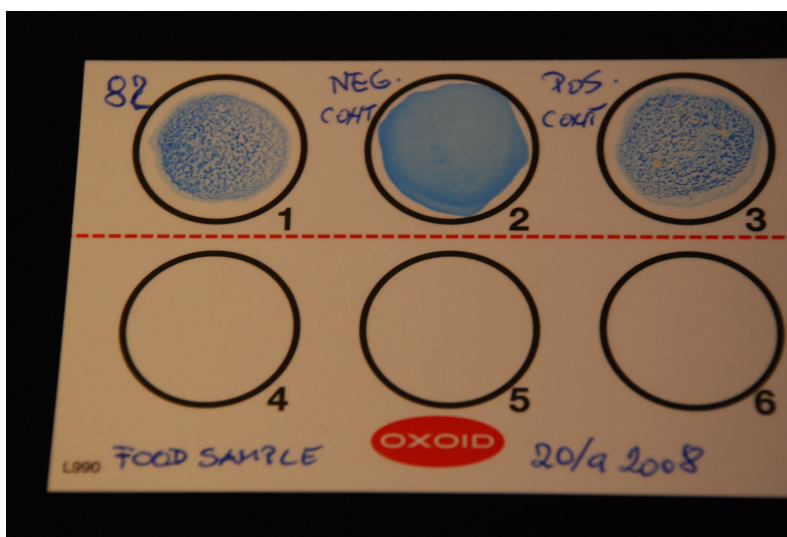


Figur 4: L-prolintest (Foto: Martirani & Karlsson).

Latex-agglutinationstest

Ett annat snabbtest som utfördes var latex-agglutinationstest, specialutformat för detektion av *Cl. difficile* (Oxoid Limited, Basingstoke, England). Testet utfördes endast på de kolonier som kunde misstänkas vara *Cl. difficile* med avseende på kolonit utseende, gramfärgning och L-prolintest. Latex-agglutination utfördes även på referensstammen, för positiv kontroll.

Principen för testet är att utnyttja IgG antikroppar, specifika mot cellväggsantigen hos *Cl. difficile*. Antikropparna är inkapslade med blå latexpartiklar. I ett testfält blandas bakteriesuspensionen med latexreagensen. När antigenet på bakterierna kommer i kontakt med antikropparna sker en reaktion som kan avläsas genom att blå klumpar bildas i testfältet. (Figur 5). Testet utfördes enligt instruktionen och avlästes inom två minuter. Vid agglutination tolkades testet som positivt.



Figur 5: Latex-agglutinationstest (Foto: Trowald-Wigh & Krovacek).

Alkoholchock

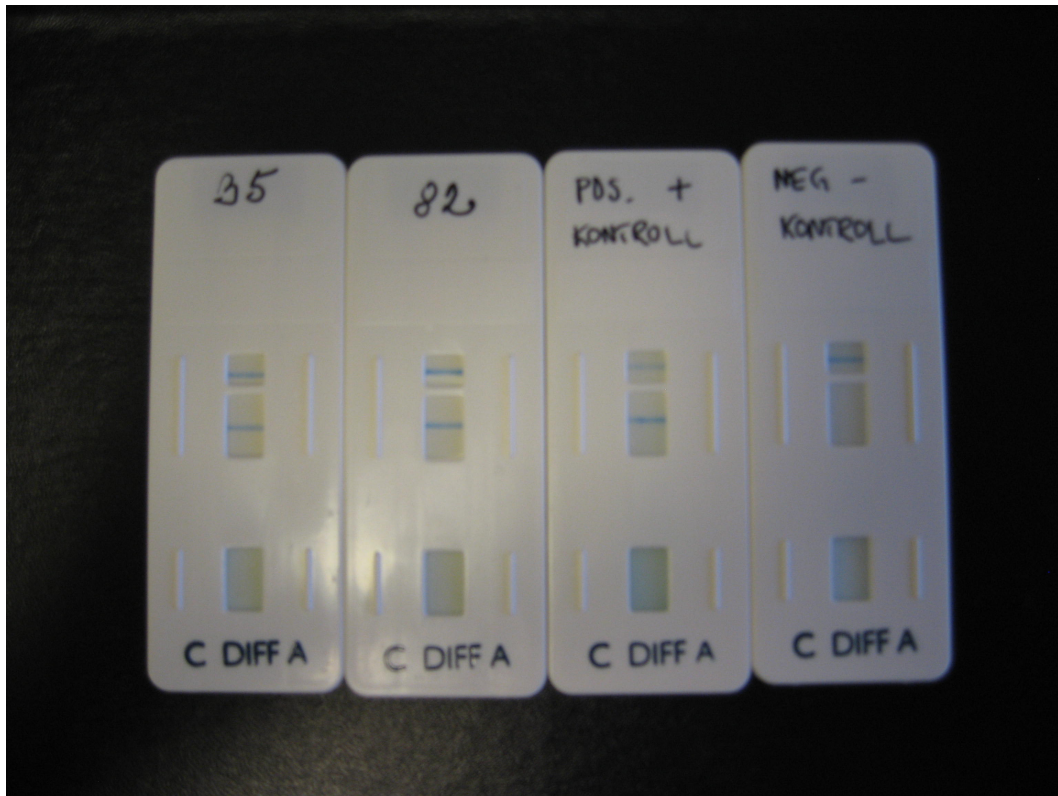
Efter 10-12 dagars inkubering gjordes utstryk från stomacherpåsen för odling på FAA och *Cl. difficile* selektivagar. Plattorna inkuberades sedan i sedvanlig ordning i 48 timmar, anaerobt vid 37°C.

Sedan gjordes utstryk efter alkoholchock i syfte att avdöda vegetativa celler av andra bakterier samt selektera fram *Cl. difficile* sporer. Alkoholchocken gick till så att ca 3-4 ml av buljongblandningen hälldes över direkt från stomacherpåsen till ett sterilt provrör i plast. Lika mycket 96% etanol tillsattes sedan med steril pipett till varje provrör. Proven vortexades och fick stå i minst 50 min. Provrören centrifugerades sedan i 3800 varv/minut i 10 minuter. Efter detta hälldes supernatanten av, och 5 ml steril, fysiologisk koksaltlösning tillsattes. Provrören vortexades återigen, och centrifugerades sedan på nytt med samma varvantal och under lika lång tid. Överflödigt koksaltlösning hälldes av och sedan upprepades proceduren ännu en gång. Varje prov tvättades alltså två gånger med koksaltlösning. Utstryk från kött sedimentet gjordes sedan med steril plastögla, på FAA och selektivagar. Plattorna inkuberades i 48 timmar vid 37°C, anaerob miljö. Avläsning av agarplattorna från buljongutstryken respektive alkoholchocken gjordes efter 48 timmar. Kriterier för identifiering av misstänkta kolonier var de samma som tidigare beskrivits.

Toxin A-test

För att kunna fastställa om misstänkta *Cl. difficile* kolonier producerade toxin A användes *Cl. difficile* toxin-A-test (Oxoid Limited, Basingstoke, England). Testet utfördes enligt tillverkarens beskrivning. Som positiv kontroll användes en *Cl. difficile* referensstam.

Testet innehåller monoklonala antikroppar för *Cl. difficile*-toxin A. En dyna rehydreras med extraherat antigen. Antigen och antikroppar bildar komplex som rör sig med kapillärkraftens hjälp genom en testremsa. Antikropparna är märkta med blå latex. På testremsan finns ett resultatfönster med immobiliserade monoklonala antikroppar för *C.difficile*-toxin A. När komplexen når detta område sker ännu en antigen-/antikroppsreaktion, denna gång mellan komplexen och de fasta antikropparna. En blå linje visar sig i resultatfönstret om toxin A finns närvarande i det extraherade provet. (Figur 6).



Figur 6 : Toxin A test (Foto:Karlsson).

Toxin-B-test

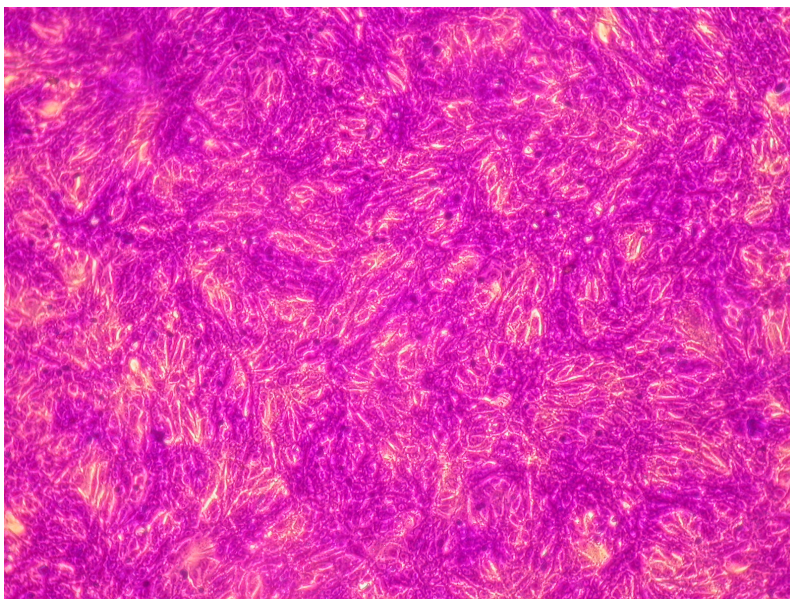
På de kolonier som testats positivt för toxin A utfördes även ett toxin B-test. Även positiv och negativ kontroll utfördes.

Toxin B testet är ett kommersiellt test från Techlab, Oxford Ltd, England. Principen för testet är att den cytotoxiska effekten hos toxin B detekteras.

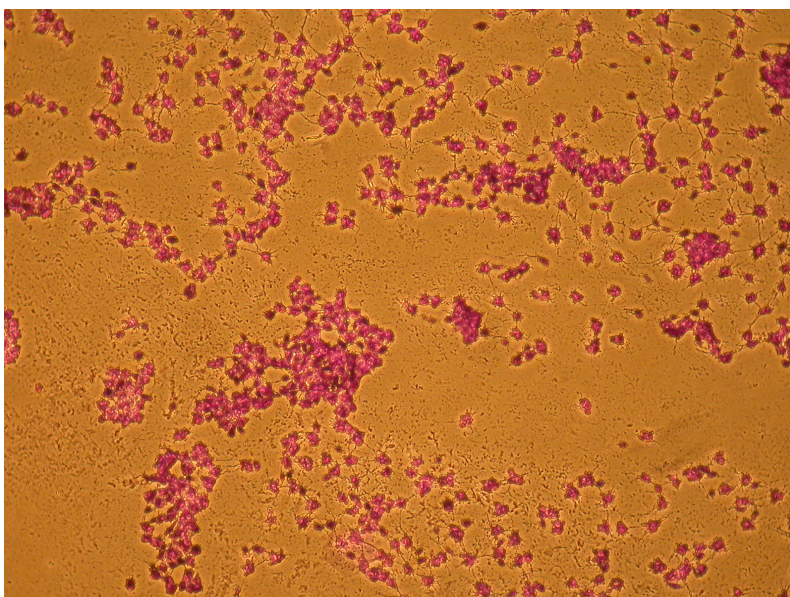
En 96-hålsplatta med brunnar täcks med ett enkelt cellager av Vero-celler (African green monkey kidney cells). Till brunnarna tillsätts sedan sterilt kulturfiltrat innehållande det förmodade toxinet. Negativ och positiv kontroll utförs också. Plattan inkuberas i 5% CO₂, 37°C. Efter 24 timmar bedöms resultaten. Vid bedömningen studeras cellerna i mikroskop. (Figur 7). Cellar som utsatts för toxin blir "trasiga" och uppvisar cytopatisk rundning. (Figur 8). För att lättare se cellerna färgas de med metylenblått efter fixering med metanol.

Påvisande av cytopatisk effekt räcker dock inte för att bekräfta att effekten är orsakad av *Cl. difficile* toxin B. Det skulle ju lika gärna kunna vara något annat bakteriellt cytotoxin. Därför har man även rader där man läser av att så kallad neutralisation har skett. Innan det sterila kulturfiltratet (som misstänks innehålla toxin B) tillsätts till dessa brunnar har det nämligen blandats med specifikt antitoxin. Tanken är då att antitoxinet skall neutralisera toxinet, och att den cytopatiska rundningen denna gång skall utebliva. Om dessa kriterier uppfylls kan testet tolkas som positivt för toxin B.

Kulturfiltraten erhöles genom att låta de bakteriestammar som skulle testas växa i BHI-buljong under anaeroba förhållanden vid 37°C i 48 timmar. Bakteriesuspensionerna överfördes sedan under sterila förhållanden till sterila provrör. Dessa centrifugerades sedan i 15 minuter. Vätskan från provrören sögs upp med pipett och filtrerades genom sterilt filter (Millipore 0,22µm). De sterila kulturfiltraten späddes sedan 1:10, 1:100 och 1:1000. Tjugo µL av både de ospädda och de spädda filtraten överfördes till respektive brunnar. Till mikrotiterplattan tillsattes också den positiva kontrollen, och den negativa kontrollen som utgjordes av steril NaCl. Neutralisationen som beskrivits ovan utfördes också på de aktuella kulturfiltraten samt på den positiva kontrollen. Testet utfördes enligt de medföljande instruktionerna.



Figur 7 : Veroceller (Foto: Krovacek et al).



Figur 8: Cytopatisk effekt på veroceller (Foto:Krovacek et al).

API-test

BioMérieux® API® 20A är ett system för biokemisk identifiering av anaerober. Detta test utfördes på en stam som efter gramfärgning och positivt L-prolin-test misstänktes vara *Cl. difficile*. Som positiv kontroll utfördes också testet på referensstammen CCUG 19126.

API-testet består av en plastbricka med 20 brunnar fyllda med olika substrat som dehydrerats. Den aktuella bakteriesuspensionen tillsätts till varje brunn och inkubering av testet sker sedan. Vid avläsning kan man med hjälp av färgförändringar se vilka kemiska reaktioner som har skett. (Figur 9). Vissa

reaktioner sker spontant, medan andra reaktioner förutsätter att reagens tillsätts. Positiva och negativa reaktioner antecknas sedan i ett schema, och en sifferkod erhålls. Med hjälp av denna kod kan man sedan i ett datasystem avläsa vilken bakterie man har.

API testet utfördes enligt de medföljande instruktionerna.



Figur 9: API-test (Foto: Martirani & Karlsson).

RESULTAT

Testresultat

Totalt undersöktes 82 livsmedelsprover för förekomst av *Cl. difficile*. Två prover var positiva för *Cl. difficile*. Båda dessa var av nötfärs, lokalt förpackade och från två olika butiker. Det visade sig också att båda isolaten producerade såväl toxin A som toxin B. För resultat från de enskilda testerna, se tabell 2.

Tabell 2. Resultat enskilda tester

Prov nr	Makro/gram	Latextest	L-prolin	API	Toxin A	Toxin B
35	+	+	+	+	+	+
82	+	+	+	Ej utfört	+	+

Clostridium difficile isolerades efter inkubering 10-12 dagar. Isolat nr 35 kunde upptäckas först efter alhoholchock, och då sågs misstänkta kolonier både på FAA och *Cl. difficile* selektivagar. Isolat nr 82 hittades enbart på selektivagar, men kunde däremot ses både på utstryket från buljongen och efter alkoholchocken.

Förekomst

Hos det totala antalet testade livsmedelsprover var förekomsten av *Cl. difficile* låg, 2,4 %. Om man enbart tittar på nötfärsproverna blir procenten något högre, 6,5%.

DISKUSSION

Detta är en pilotstudie, den första i sitt slag angående förekomst av *Cl. difficile* i köttprodukter i Sverige. Eftersom en pilotstudie är av begränsad omfattning kan man omöjligt dra några långtgående vetenskapliga slutsatser, och det är heller inte meningen. En pilotstudie kan däremot ge en vink om vad som kan vara intressant att studera vidare i mer omfattande undersökningar.

Resultaten av de utförda undersökningarna visar dock att *Cl. difficile* kan förekomma i kött som säljs i svenska butiker. Av totalt 82 prover innehöll två den aktuella bakterien. Båda dessa livsmedelsprover var av nötfärs, svenskt kött, och en annan gemensam nämnare var att båda köttfärspaketen var lokalt packade i livsmedelsbutik. Nämnas bör dock att de båda positiva livsmedelsproverna härrörde från två olika butiker, och hittades vid två skilda provtagningstillfällen.

Undersökningen fokuserade främst på malet kött. Köttfärs är intressant ur ett livsmedelshygieniskt perspektiv då det utsätts för mer hantering än andra styckdetaljer, består av mer exponerad yta, och därmed löper högre risk att kontamineras av patogener. Köttfärs är också ett populärt livsmedel bland svenska konsumenter.

I denna studie hittades *Cl. difficile* enbart i nötfärs. Fläskfärs, lammfärs, fågelfärs och andra undersökta varor visade sig vara negativa. Noteras bör att antalet undersökta nötfärspaket faktiskt var högre än något annat av de i studien ingående

livsmedlen, och möjligheten att hitta bakterien i just nötkött blev då större. Att fynden gjordes i just nötfärs kan ändå vara intressanta i ett längre perspektiv. Om man jämför med tidigare studier i andra länder ser man att deras fynd också varit i nötkött. Den kanadensiska studien gjordes visserligen enbart på nöt- och kalvfärs (Rodriguez-Palacios *et al*, 2007), men den franska undersökningen omfattade både nöt- och fläskkött (Bouttier *et al*, 2008). I den franska studien, där 50 prover av fläsk och 65 prover av nöt undersöktes, hittades bakterien enbart i nötköttet. Uppgifter om i vilka livsmedel bakterien hittades i den amerikanska undersökningen, finns idag tyvärr ej tillgängliga (McClain, 2006).

Att bakterien hittills endast har förekommit i nötkött kan vara intressant att ha i bakhuvudet inför kommande forskning, även om det är för tidigt att nu dra några ytterligare slutsatser. Om det visar sig att *Cl. difficile* även i fortsättningen enbart påträffas i nötkött måste man börja fråga sig varför. Bakterien förekommer ju bevisligen hos många olika djurslag förutom nöt, däribland andra livsmedelsproducerande djurslag som svin och kyckling.

I föreliggande undersökning var förekomsten av *Cl. difficile* 2,4%. Beräkningen är då gjord på det totala antalet undersökta livsmedelsproverna. I den franska undersökningen nämner man en prevalens på 4,6% (Bouttier *et al*, 2008). Här har man dock bara räknat på nötköttet, d.v.s. att 3 av de 65 nötfärsproverna var positiva. Om man istället tar hänsyn till hela den franska studiens omfattning, med totalt 115 livsmedelsprover, borde prevalensen bli 2,6%. Man kan även i vår svenska studie fokusera på nötköttet. Då blir förekomsten av *Cl. difficile* 6,5%. Hur man än väljer att göra kan man se att den franska och den svenska undersökningen stämmer väl överens i sina resultat. De skiljer sig båda däremot nämnvärt från den kanadensiska studien, där bakterien förekom i 20% av köttfärsen (Rodriguez-Palacios *et al*, 2007), men också från den amerikanska motsvarigheten, där prevalensen enligt uppgift skulle varit 30% (McClain, 2006). Skillnaden mellan Europa och Nordamerika är en intressant iakttagelse, men orsakerna till detta kan man idag bara spekulera kring.

De isolat som hittades i min studie producerade både toxin A och toxin B. Eftersom det är framför allt toxinerna som utgör bakteriens sjukdomsframkallande förmåga är denna iakttagelse intressant. I den franska studien nämner man ej stammarnas förmåga att producera toxin A eller toxin B, utan där tycks man framför allt fokusera på det binära toxinet. I den kanadensiska studien däremot visade sig de flesta av isolaten kunna producera båda toxinerna. Det bör även i eventuella framtida undersökningar vara av intresse att undersöka toxinproducerande förmåga hos alla funna isolat.

Den presenterade pilotstudien omfattar 82 livsmedelsprover inköpta under april, maj, juni och september i och omkring Uppsala. För att kunna dra några slutsatser om den egentliga förekomsten av *Cl. difficile* i köttprodukter i svenska butiker skulle ett större antal produkter behöva provtagas. En klarare och mer rättvis bild av verkligheten skulle man få om livsmedlen köptes in under en längre tid, exempelvis ett år, och om inköpen spreds över ett större geografiskt område. I en eventuell framtida studie bör man ha detta i åtanke.

Runt om i världen diskuterar nu många forskare huruvida *Cl. difficile* skulle kunna vara en ny livsmedelsproducerande livsmedelsburen patogen. Klart sedan länge är att bakterien kan återfinnas hos många av de livsmedelsproducerande djurslagen. Nyligen genomförda studier i Kanada, USA och Frankrike, och nu även i Sverige, visar att *Cl. difficile* faktiskt också kan förekomma i livsmedel. Flera av undersökningarna är ej tillräckligt omfattande för att några slutsatser ska kunna dras. Forskarna är medvetna om detta, och alla påpekar att större undersökningar behöver göras, men alla är också rörande överens om att de hittills påträffade resultaten är intressanta. Man har trots allt visat att bakterien kan förekomma i livsmedel, något som man tidigare ej var medveten om.

För att öka kunskapen om *Cl. difficile* som en ny livsmedelsburen patogen krävs mer omfattande undersökningar gällande bakteriens förekomst i livsmedel. Man behöver veta i vilka köttprodukter den förekommer och i vilken utsträckning. Man behöver också titta närmare på hur patogenen faktiskt hamnar i livsmedlet. Är det vid slakt av det livsmedelsproducerande djuret, eller sker kontaminationen senare i livsmedelskedjan? Kan detta förebyggas på något sätt? För att kunna konstatera att en patogen är livsmedelsburen krävs ett fall där bakterien först kan isoleras från patienten, och därefter att ett identiskt isolat kan isoleras från ett livsmedel som patienten har förtärt. Detta har ännu inte bevisats avseende *Cl. difficile*, och fram till att detta sker kan man egentligen inte säga något om smittspridning via livsmedel. Mer forskning inom området krävs.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alfa, M.J., Kabani, A., Lyster, D., Moncrief, S., Neville, L.M., Al-Barrak, A., et al (2000). Characterization of a toxin A negative, toxin B positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosokomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 38, 2706-14
- Al Saif, N. & Brazier, J.S. (1996). The distribution of *Clostridium* in the environment of South Wales. Journal of medical Microbiology 45, 133-37.
- Arroyo, L.G, Kruth, S.A., Willey, B.M., Staempfli, H.R., Low, D.E., Weese, S.J. (2005). PCR Ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. Journal of Medical Microbiology 54, 163-66.
- Barbut, F. & Petit, J.-C. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clinical microbiology and Infection 7, 405-10.
- Bartlett, J.G., Chand, T.W., Gurwith, M., Gorbach, S.L. & Onderdonk, A.B. (1978). Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia*. New England Journal of Medicine 298, 531-34.
- Bignardi, G.E. (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp infect 40, 1-15.
- Bishara, J., Bloch, Y., Garty, M., Behor, J., Samra, Z. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates in a tertiary medical center, Israel. (2006). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 54, 141-44.
- Borriello, S.P. (1979). *Clostridium difficile* and its toxin in the gastrointestinal tract in health and disease. Research and Clinical Forums 1, 33-5.
- Borriello, S.P., Welch, A.R., Barclay, F.E. & Davies, H.E. (1988). Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. Journal of Medical Microbiology 25, 191-6
- Borriello, S.P., Davies, H.A. & Barclay, F.E. (1988). Detection of fimbriae among strains of *Clostridium difficile*. FEMS Microbiology Letters 49, 65-7.
- Borriello, S.P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. Journal of antimicrobial Chemotherapy 41, Suppl C, 13-19.

- Bouttier, S., Barc, M.C., Felix, B., Lambert, S., Torkar, A., Collignon, A, Barbut, F. (2008). Screening for *Clostridium difficile* in meat from French retailers. In: 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008. Abstract number: P1494.
- Broda, D.M., DeLacy, k.M., Graham Bell, R., Braggins, T.J.Cook, R.L. (1996). Psychrotrophic *Clostridium spp* associated with blown pack spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. International Journal of food Microbiology 29, 335-52.
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A., Gunnarsson, A. (1997). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. Equine veterinary Journal 29, 279-84.
- Båverud, V., Franklin, A., Gunnarson, A., Gustafsson, A., Hellander- Edman, A. (1998). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for Rhodococcus equi pneumonia. Equine veterinary Journal 30, 482-88.
- Chernak, E., Johnson, C.C., Weltman, A., McDonald, L.C., Wiggs, L., Killgore, G., Thomson, A., LeMaile- Williams, M., Tan, E., Lewis, F.M. Severe *Clostridium difficile*- associated Disease in Populations Previously at Low risk- Four States, 2005. (2005). [online] tillgänglig: <http://www.cdc.gov.mmwr/preview/mmwrhtml/mm5447a1.htm> [2008-11-03]
- Davies, H.A. & Borriello, S.P. (1990). Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. Microbial Pathogenesis 9, 141-6.
- Elliott, B., Chang, B.J., Golledge, C.L., Riley, T.V. (2007). *Clostridium difficile*- associated diarrhoea. Internal Medicine Journal 37, 561-68.
- Eveillard, M., Fourel, V., Barc, M.-C., Kerneis, S., Coconnier, M.H., Karjalainen, T. et al. (1993) Identification and characterisation of adhesive factors of *Clostridium difficile* involved in adhesion to human colonic enterocyte-like Caco-2 and mucussecreting HT29 cells in culture. Molecular Microbiology 7, 371-81.
- George, W.L., Sutter, V.L., Goldstein, E.J., Ludwig, S.L. & Finegold, S.M. (1978). Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. Lancet I, 802-3
- George, R.H. & Symonds, J.M. (1978). Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. British Medical Journal 1, 695.

- Gerding, D.N. (2004). Clindamycin, Cephalosporins, Fluoroquinolones and *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: This Is an Antimicrobial Resistance Problem. *Clinical Infectious Disease* 38, 646-8.
- Geric, B., Carman, R.J., Rupnik, M., Genheimer, C.W., Sambol, S.P., Lysterly D.M. et al. (2006). Binary toxin producing, large *clostridial* toxin negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis* 193, 1143-50.
- Hall, I.C. & O'Toole, E. (1935). Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Disease of Children* 49, 390-402.
- Karjalainen, T., Barc, M.-C., Collignon, A., Trollé, S., Boureau, H., Cotte-Lafitte, J. Et al. (1994). Cloning of genetic determinant from *Clostridium difficile* involved in adherence to tissue culture cells and mucus. *Infection and Immunity* 62, 4347-55.
- Kim, K.H., Fekety, R., Batts, D.H. et al (1981). Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 143, 42-50
- Krishna, M.M., Powell, N.B.L. & Borriello, S.P. (1996). Cell surface properties of *Clostridium difficile*: hemagglutination, relative hydrophobicity and charge. *Journal of Medical Microbiology* 44, 115-23.
- Kuijper, E.J., de Weerd, J., Kato, H., Kato, N., van Dam, A.p., van der Vorm, E.R., Weel, J., van Rieenen, C., Dankert, J. (2001). Nosokomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 528-34.
- Kuijper, E.J., Coignard, B., Tüll, P. (2006). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, Suppl 6, 2-18.
- Kuijper, E.J., Coignard, B., Brazier, J., Suetens, C., Drudy, D., Wiuff, C., Pituch, H., Reichert, P., Schneider, F., Widmer, A.F., Olsen, K.E., Allenberger, F., Notermans, D.W., Barbut, F., Delmée, M., Wilcox, M., Pearson, A., Patel, B.C., Brown, D.J., Frei, R., Åkerlund, T., Poxton, I.R., Tüll, P. (2007) Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Eurosurveillance* 12, 163-66.

- Larsson, H.E., Price, A.B., Honous, P., Borriello, S.P., (1978). *Clostridium difficile* and the aethiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* I, 1063-66.
- Lefebvre, S.L., Arroyo, L.G., Weese, S.J. (2006). Epidemic *Clostridium difficile* Strain in Hospital Visitation Dog. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1036.
- Lyerly, D.M., Barrosco, L.A., Wilkins, T.D., Depitre, C., Corthier, G. (1992). Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* 60, 4633-9.
- McClain, C. (2006). Potentially fatal bacteria found in Tucson meats. [online] tillgänglig: <http://cals.arizona.edu/media/archives/7.8.htm> [2008-11-14]
- Mylonakis, E, Ryan, E.T., Calderwood, S.B. (2001). *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Arch Intern Med* 161, 525-33.
- O'Neill, G., Adams, J.E., Bowman, R.A., Riley, T.V. (1993). A molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from humans, animals and their environments. *Epidemiology and Infection* 111, 257-64.
- Pelaéz, T., Alcalá, L., Alonso, R, Rodriguez-Créixems, M., Garcia-Lechuz, J.M., Bouza, E. (2002). Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1647-50.
- Pepin, J., Alary, M.E., Valiquette, L., Raiche, E., Ruel, J., Fulop, K., Godin, D., Bourassa, C. (2005). Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1591-7.
- Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G., Popoff, M.R. (1997). Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD 196. *Infect immun* 65, 1402-7
- Pituch, H., Brazier, J.S., Obuch-Woszczatynski, P., Wultanska, D., Meisel-Mikolajczyk, F., Luczak, M. (2006). Prevalence and association of PCR ribotypes of *Clostridium difficile* isolated from symptomatic patients from Warsaw with macrolide-linkosamide-sreptogamin B (MLSB) type resistance. *Journal of Medical Microbiology* 55, 207-13.
- Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakhis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G. Et al. (1995). *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 95, 2004-11.

- Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Peregrine, A.S., Trotz-Williams, L.A., Arroyo, L.G., Brazier, J.S., Weese, S.J. (2006). *Clostridium difficile* PCR Ribotypes in Calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 12, n11.
- Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Trotz-Williams, Weese, S.J. (2007). *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 13, 485-87.
- Rupnik, M. (2007). Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clinical Microbiology and Infection* 13, 457-59.
- Seddon, S.V., Hemingway, I. & Borriello, S.P. (1990). Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *Journal of Medical Microbiology* 31, 169-74.
- Simango, C. (2006). Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 1146-50.
- Simango, C & Mwakurudza, S. (2008). *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market place in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. *International Journal of Food Microbiology* 124, 268-70.
- Smittskyddsinstitutet. (2007). A report on Swedish Antimicrobial Utilisation and Resistance in Human Medicine. [online] tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Publikationer/swedres-strama-smi-2007.pdf> [2008-11-29]
- Smittskyddsinstitutet. (2008 a). SMI-dag: *Clostridium difficile*- diagnostik, epidemiologi och prevention. [online] tillgänglig: <http://www.smi.se/kalendarium/clostridium-difficile-diagnostik-epidemiologi-och-prevention/> [2008-11-29]
- Smittskyddsinstitutet. (2008 b). första fallet i Sverige av *Clostridium difficile* PCT ribotyp 027. [online] tillgänglig: <http://www.smi.se/publikationer/smis-nyhetsbrev/epi-aktuellt/epi-aktuellt-2008/epi-aktuellt-vol-7-nr-22-29-maj-2008/#p12481> [2008-11-29]
- Songer, G.J., Post, K.W., Larson, D.J., Jost, H.B., Robert, G.D. (2000). Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine health and production* 8, 185-89.

- Songer, G.J. (2004). The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Animal Health Research Reviews* 5, 321-26.
- Songer, G.J. & Anderson, M.A. (2006). *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12, 1-4.
- Taha, S., Johansson, O., Jonsson, S.R., Heimer, D., Krovacek, K. Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. (2007). *Comparative Immunology, Microbiology and infectious Diseases* 30, 163-74.
- Voth, D.E., Ballard, J.D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanisms of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005 18, 247-63.
- Weese, S.J., Rousseau, J., Arroyo, L. (2005). Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *Can Vet J* 46, 513-16.